

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

**SZABADALMI
LEÍRÁS
SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY**

(21) A bejelentés száma: 1484/88
(22) A bejelentés napja: 1988. 03. 23.

(40) A közzététel napja: 1992. 09. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1995. 02. 28. SZKV 95/02

(11) Lajstromszám:

210 122 B

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 35/60
A 61 K 31/20
A 61 K 33/04
A 61 K 35/72

(72) Feltaláló:

A feltalálók nevük feltüntetésének mellőzését kérték,
(HU)

(73) Szabadalmas:

BIOREX Kutató-Fejlesztő Kft., Budapest (HU)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

**(54) Eljárás a keringési rendszer és a szív tromboembolitikus állapotaira ható
gyógyászati készítmény előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány a szívre és a keringési rendszer tromboembolitikus állapotaira ható gyógyászati készítmények előállítására vonatkozik. A találmány értelmében úgy járnak el, hogy 0,5–50 tömeg%-ban szeléntartalmú élesztő-típusú mikroorganizmust, valamint 99,5–

0,5 tömeg% 18–24-szénatomos, legalább két kettős kötést tartalmazó egy vagy több telítetlen zsírsavat kívánt esetben adalékanyagokkal és antioxidánsal elegyítenek és ismert módon gyógyszerkészítménnyé alakítanak.

HU 210 122 B

legalább két telítetlen kötést tartalmazó zsírsavakat vagy ezek származékait kívánt esetben a gyógyszerkészítésben szokásos vivő- és/vagy hordozóanyagokkal és kívánt esetben antioxidánsal önmagában ismert módon gyógyszerkészítménnyé alakítunk.

A találmány szerinti eljárással célszerűen olyan készítményeket állítunk elő, melyek eikozapentaénsavat /EPA/ és dokozahexaénsavat /DHA/, valamint szeléntartalmú élesztőt tartalmaznak.

A készítmény egyik komponenséül szolgáló C₁₈₋₂₄ ω-3 telítetlen zsírsavak alapanyagaként különböző tengeri és édesvízi halakból, így elsősorban makrélából, tőkehalból, heringből, szardíniából, tintahalból és busából, továbbá a halak májából nyerhető olajok, például a tőkehalmájolaj /csukamájolaj/ és cápa-májolaj használhatók.

A halolajok az EPA-n és a DHA-n kívül nagy mennyiségben tartalmaznak telített és kismértékben telítetlen zsírsavakat, valamint el nem szappanosítható komponenseket. Ezen alkotórészek eltávolítása igen fontos, hiszen a halolajokból készített gyógyászati készítmények dózisének növelése érzékenyen emelné a bevitt kalóriát, valamint a vér triglicerid-szintjét. Emellett az el nem szappanosítható alkotórészek tartalmazhatnak szteroidokat, például koleszterint, D-vitamint /annak provitaminját/ és/vagy A-vitamint. A D- és az A-vitaminok az emberi szervezetben kumulálódnak, így az ilyen vitaminokat tartalmazó készítménnyel nem lehetne a kívánatos hatás eléréséhez szükséges tartós kezelést végezni. Ezért a halolajból eltávolítjuk a felsorolt alkotóelemeket, így a telített és kismértékben telítetlen zsírsavakat, az el nem szappanosítható alkotóelemeket, mint például a koleszterint, az A- és D-vitamint. Ily módon a halolajban az EPA és DHA együttes mennyisége 50% fölé dúsul.

Mikroorganizmusként célszerűen olyan törzseket használhatunk, amelyek humán szempontból nem toxikusak, és így emberi fogyasztásra alkalmasak. Erre a célra legmegfelelőbbek a biotechnológiában is széles körben alkalmazott törzsek, mint például a *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp., *Acetobacter* sp., *Streptococcus* sp., *Torula* sp., *Kluyveromyces* sp., *Candida* sp., *Brettanomyces* sp., *Brevibacterium* sp., *Saccharomyces* sp., *Torulopsis* sp., *Pichia* sp., *Hansenula* sp., *Oidium* sp., *Rhodotorula* sp., *Trichospora* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Monascus* sp., *Aspergillus* sp. stb. törzsek fajtái.

A találmány szerinti készítmény oxidációjának gátlására aktív tartósfőzőszerként α-tokoferolt /E-vitamin/, glutationt vagy hagyományos antioxidánsokat, mint például butil-hidroxitoluolt célszerű használni.

Vivő- és hordozóanyagként a gyógyszerkészítésben szokásos anyagokat, mint például laktózt, keményítőt vagy magnézium-sztearátot alkalmazhatunk.

A farmakológiai vizsgálatok a készítmény egészséget károsító mellékhatásoktól való mentességét igazolták, mert a patkánymáj mikroszomális enzimrendszerében használatos dózis százszoros mennyiségénél sem tapasztaltunk elváltozást. A készítménnyel történő kezelés szignifikáns módon csökkent a kontrollhoz

viszonyítva a szervezetben felhalmozódó lipofuscin mennyiségét. A találmány szerinti készítménnyel Wistar nőstény patkányokon végzett 6-hetes vizsgálatok alapján egyértelmű trombocita aggregáció gátlást tapasztaltunk.

A készítmény optimális hatásos napi dózisa /75 kg-os átlagos testtömegre számolva/ 2 g. Az olaj-komponens átlagosan 22% EPA-t és 43% DHA-t tartalmaz. Az élesztőpor grammonként átlagosan 40 µg szelént tartalmaz.

A találmány szerinti készítmény főbb előnyei a következők:

1. Egyesíti az EPA és a DHA, valamint a szelén és az élesztő előnyös tulajdonságait.

2. Kiküszöböli az ismert halolajtartalmú készítmények azon káros hatásait, melyeket a telített lipid komponensek, például szterinek, valamint az A- és D-vitamin tartalom okozhat.

3. Kiküszöböli a politelítetlen zsírsavak fogyasztása esetén fellépő „ceroid lipofuscinosis” lehetőségét.

4. A szelént természetes anyagként mikroorganizmusban, mint pl. baktériumban, gombában, élesztőben feldúsítva tartalmazza, speciális mikroorganizmussal együtt adagolt szelén jobban felszívódik, és kedvező hatását előnyösebben fejti ki.

5. A szerves szelén mikroorganizmusokban így elsősorban élesztőben ipari méreteken, fajlagosan nagy-mennyiségben és olcsón állítható elő.

6. Kedvező gyógyászati hatást fejt ki atopikus zavarok esetén, és ekcéma, asztma, allergiás tünetek, allergiás rhinitis és/vagy atopikus összefüggésű zavarok, például migrén, Crohn-féle betegség, fekélyes colitis, oútis media, nefrotikus szindróma, cukorbetegség preventív kezelésére is felhasználható. Különösen alkalmas a keringési rendszer zavarai, annak apoplexiás megnyilvánulásai, trombo-embolikus állapotok, így agyvérzés, infarktus, fiatalokúak Keshan-szindrómája kezelésére, valamint a rendellenes állapotok kialakulásának megelőzésére.

A találmány szerinti készítményhez alkalmazott ω-3 politelítetlen zsírsavakat az 1. példában leírtak szerinti, a szelénrel dúsított mikroorganizmust pedig a 2-6. példák szerint állíthatjuk elő. A 7-9. példák a találmány szerinti gyógyászati készítmények előállítását szemléltetik.

1. példa :

24 kg makréla olajat 60 °C-on feloldunk 16 liter metanolban 50-60 °C közötti hőmérsékleten, keverés közben 8 kg 40%-os NaOH oldatot csepegtetünk hozzá, majd az elegyet 60 °C-on tartva további 45 percig kevertetjük. Mintegy 60 °C hőmérsékleten 20 kg 15%-os sósavat adunk az oldathoz. A fázisokat elválasztjuk, majd a szerves fázist még 10 kg 15%-os sósavval, majd mintegy 180 liter forró csapvízzel semlegesre mossuk. Az így kialakult fázisokat ismét elválasztjuk. Az olajos fázishoz 100 liter acetont adunk, felmelegítjük mintegy 45 °C-ra, és hozzáöntünk 30 liter vízben feloldott 3,8 kg LiOH·H₂O-t. Fél óra keverés után éjszakán át állni hagyjuk, majd leszűrjük, és az aceto-

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a szív és a keringési rendszer tromboembolitikus állapotaira ható gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 0,5–50 tömeg%, előnyösen 5–35 tömeg%, célszerűen 15–25 tömeg% szelén-tartalmú élesztő-típusú mikroorganizmust, valamint 99,5–50 tömeg%, előnyösen 95–65 tömeg%, célszerűen 85–75 tömeg% 18–24 szénatomos, legalább két telítetlen kötést tartalmazó egy vagy több zsírsavat és/vagy ezek származékait kívánt

esetben a gyógyszerkészítésben szokásos vivő- és/vagy hordozóanyagokkal és kívánt esetben antioxidánssal önmagában ismert módon gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

5 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy telítetlen zsírsavként tengeri halak olajából extrahált zsírsavakat használunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy telítetlen zsírsavként 5,8,11,14,17-eikozapentaénsavat és 4,7,10,13,16,19-dokozahexaénsavat használunk.

nos szűrletet bepároljuk. Körülbelül 8 kg 15%-os só-savval megsavanyítjuk és hexánnal háromszor kirázzuk, majd a hexános fázist bepároljuk. A tisztítási művelet során végig N_2 -atmoszférában dolgozunk. Így 6,4 kg tisztított halolajat nyerünk.

Az így tisztított makrélaolaj 1 kg-ját 60 °C-on hozzácsépegtetjük 3 kg karbamid 9 liter metanollal készített oldatához. Az elegyet 2 órán át ezen a hőmérsékleten keverjük. Lehűlés után éjszakán át mélyhűtőben -10 °C-on állni hagyjuk, majd lesűrjük, és a szűrletet bepároljuk. A bepárolt anyaghoz 2,5 liter 1:1 hígítású sósavat öntünk, és 15 percig keverjük. Hexánnal kirázzuk, a hexános fázist vízzel semlegesre mossuk, Na_2SO_4 -tal szárítjuk, majd bepároljuk. Így 0,34 kg ω -3 telítetlen zsírsavat kapunk. Jódszám: 315; EPA-tartalom: 24%; DHA-tartalom: 42%.

2. példa:

5-literes üveg palackokba 2-2 l sterilizált malátakivonatos folyékony táptalajt öntünk, és glükózzal 13% dúsítjuk. 5 µg/ml nátrium-szelenitet teszünk hozzá, majd beoltjuk *Saccharomyces cerevisiae*-vel. Levegőztetéssel 32 °C-on 72 óráig neveljük. A 48. órában újabb 5 µg/ml nátrium-szelenitet adunk a tenyészethez.

Szűrés után a sejteket desztillált vízzel többször átmoszuk, majd 68–70 °C-on szárítjuk. Az anyagot mikronizáljuk, majd atomabszorpciós módszerrel meghatározzuk a Se-tartalmat. A kapott érték 300 µg/g.

3. példa:

500 ml-es Erlenmeyer-lombikokba 100 ml élesztő-kivonatos folyékony tápoldatot töltünk steril körülmények között, majd 5 µg/ml mennyiségű Na-szelenitet teszünk bele, és beoltjuk *Aspergillus sojae* gombával. 28–30 °C-on rázajuk a tenyészeteket. A tenyésztés 3. napján újabb 5 µg/ml Na-szelenitet teszünk a kultúrába. 5 nap eltelte után a szárazanyagot kiszűrjük, mosuk, majd a 2. példa szerinti módon szárítjuk. Mikronizálás után a minta műszeresen meghatározott Se-tartalma 300 µg/g.

4. példa:

A 3. példával azonos módon alkalmazzuk a *Torulopsis utilis* nevű élesztőt. A tenyésztés során nyert mikrobamög Se-tartalma 120 µg/g.

5. példa:

A 3. példa szerinti módon elkészített tápoldaton *Streptococcus thermophilus*-t nevelünk 45 °C-on. A nevelési és kinyerési periódus után a mikroba-por Se-tartalma 420 µg/g.

6. példa:

A 3. példával azonos módon neveltünk *Lactobacillus mesenteroides* baktériumfajt. Ez esetben a táptalajt 1% glükózzal és 2% kalcium-karbonáttal is kiegészítjük. A kapott baktérium 300 µg/g Se-t tartalmaz.

7. példa:

150 g 65%-os dúsított makrélaolajhoz /EPA-tarta-

lom: 24%, DHA-tartalom: 42%/ 10 g Se-élesztőport keverünk /Se-koncentráció: 260 µg/g élesztőpor/. A keveréket homogenizáljuk. A homogenizátumot 0,1% E-vitaminnal tartósítjuk. A kapott hatóanyagot lágy zselatin gyöngy kapszulába vagy lágy zselatin kapszulába töltjük, és buborék-csomagolással szereljük ki.

8. példa:

Mindenben a 7. példa szerint járunk el, azzal az eltéréssel, hogy az alábbi kiindulási anyagokat használjuk: 400 g 65%-os dúsított tőkealmájolaj, melynek EPA tartalma 22%, DHA-tartalma 43%; 100 g élesztőpor 120 µg/g Se-tartalommal és 0,4 mg E-vitamin. A homogenizátumot 500 mg hatóanyag befogadására alkalmas kapszulába töltjük.

9. példa:

Ismert gyógyszerészeti eszközökkel és eljárással az alábbi összetételű tablettákat állítjuk elő:

EPA-ra és DHA-ra nézve dúsított tőkealmájolaj, mely 0,1% E-vitamin tartósítószerrel tartalmaz (DHA-tartalma: 43%, EPA-tartalma: 22%)	200,0 mg
Se-élesztő (Se-koncentráció: 150 µg/g élesztőpor)	86,0 mg
Laktóz	140,0 mg
Keményítő	60,0 mg
Polivinil-pirrolidon	3,5 mg
Magnézium-sztearát	3,5 mg

Kívánt esetben a tablettákat drázsírozó gépen cukorral vagy más anyaggal vonjuk be.

A trombocita aggregáció gátló hatást Wistar albino nőstény patkányok 10-es csoportjain 6 hetes p. o. kezeléssel vizsgáltuk. Az állatok I. csoportja 67% zsírsav-származék és 33% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g) keverékét, a II. csoport 94% zsírsav-származék és 6% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g), a III. csoport 50% zsírsav-származék és 50% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g) keverékét kapta. A IV. (kontroll) csoport 67% fiziológiás sóoldat és 33% élesztő (szelén-mentes) keverékét kapta.

A 6 hetes kezelést követően a vena cava inferiorból vért vettünk, a vérmintákat 3,5%-os Na-citráttal összekevertük, centrifugáltuk és a kapott, trombocita-dús plazmában, ADP különböző koncentrációval trombocita aggregációt idéztünk elő. Azt a minimális ADP-koncentrációt, melynél az aggregáció jelentkezik, ADP küszöb-koncentrációnak nevezzük. Ennek átlagos értéke (\bar{X}) a kontroll-csoportban 11,1 µ; a találmány szerinti kombináció hatására ez jelentősen emelkedik, mint azt az alábbi táblázat mutatja:

	\bar{X} (µM)
I. csoport	64,5
II. csoport	52,3
III. csoport	88,5
IV. (kontroll) csoport	...

A trombocita aggregáció gátló hatás jelentős, és 50–94% zsírsavat (vagy zsírsav-származékot) és 33–50% élesztőt (Se-tartalmú élesztő) tartalmazó kombináció esetében megfelelően bizonyított.